

様式第 1 号

論文内容要旨

The structure of SeviL, a GM1b/asialo-GM1 binding R-type
lectin from the mussel *Mytilisepta virgata*

学位申請者氏名：鎌田 健一
研究指導教員：Jeremy R.H. Tame

1. 序

細胞表面を覆う糖鎖構造は細胞ごとに多様で、細胞の状態に依存してその様相を変化させることが明らかになってきている。外来異物の認識や細胞間コミュニケーションは、これを媒介するシグナル発信分子としての機能を持つ「レクチン*1」と呼ばれるタンパク質によって制御されている。レクチンはほぼ全ての生物に存在し、これまでに 2000 種以上の立体構造が解明されてきた。(1)

申請者らの研究グループは、二枚貝からナチュラルキラー細胞の持つ糖鎖である asialo-GM1*2 と GM1b*3 への結合能を有するレクチン SeviL を発見した。(2) SeviL はそのアミノ酸配列から、R 型レクチン*4 ファミリーに属することが明らかとなっている。また SeviL を腫瘍細胞に投与すると細胞死を示す一方で、正常単球に加えるとマクロファージへの分化を促すことが確認された。この結果から、糖鎖を介して細胞に結合し、細胞毎に異なるシグナルを発信させるポテンシャルがあることを示唆するが、これらの詳細な機構を考察するための手掛かりが存在しなかった。

一般的なレクチンが単糖を弱い相互作用で認識するのに対して、SeviL は asialo-GM1 と GM1b という糖鎖に特異的に、強く結合することが明らかとなっている(図 1)。このようにレクチンが特異的、かつ強い結合をすることは珍しく、特に asialo-GM1 にのみ特異的に結合する例は本件が初めてである。

本研究では SeviL の構造・機能を、X 線結晶構造解析をはじめとする構造生物学の手法、また ITC や AUC といった相互作用解析手法を用いて詳細に解明することを目的とする。これによりレクチンが直鎖の糖鎖を認識するメカニズムの解明や、糖鎖解析ツールとしての応用が期待できる。

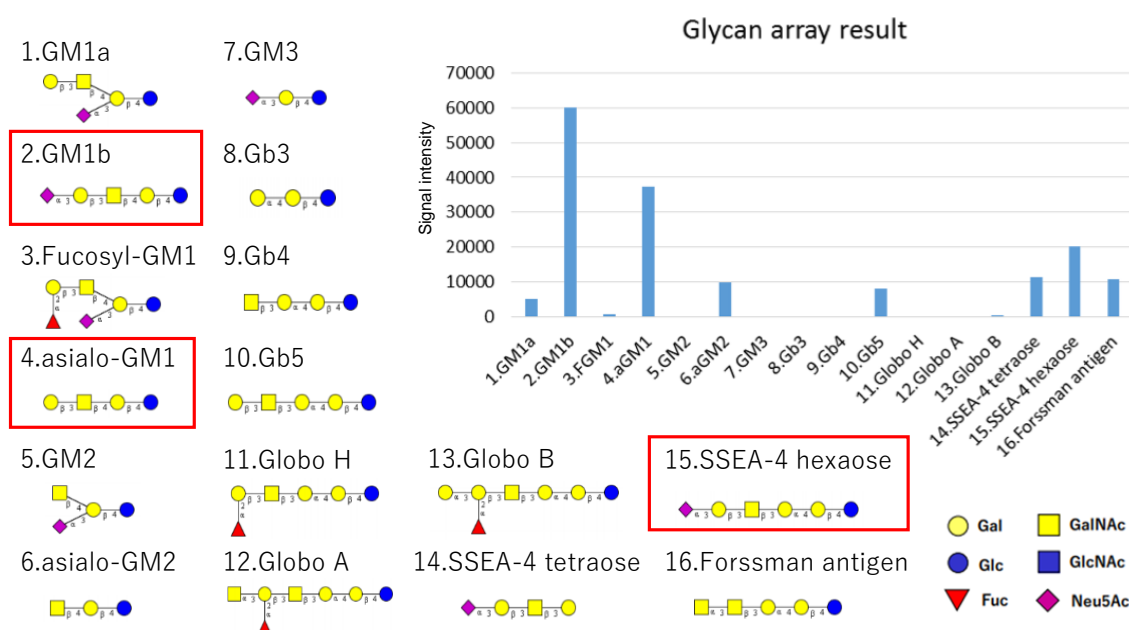


図1. 糖鎖アレイの結果

2. 実験方法

1) タンパク質発現系の構築・大量発現・精製

SeviL のアミノ酸配列をコードし、大腸菌のタンパク質発現系に最適化された遺伝子を、制限酵素(NdeI/BamHI)を使用して pET28 ベクターに組み込んだ。

作製したプラスミド DNA を用いて大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換させた。LB 培地を用いて 37°C で振盪培養、O.D.₆₀₀ が 0.6 程度となったところで IPTG を終濃度 0.5 mM となるように添加し、37°C で 3 時間(単量体(Q12RF126K)は 20°C で終夜)タンパク質の発現誘導を行った。得られた菌体を超音波で破碎し、Ni-NTA カラムと陰イオン交換カラム、ゲルろ過カラムで精製し、得られたサンプルを最終精製物とした。

2) 結晶化実験

精製した SeviL を 10 mg/mL に濃縮し、結晶化スクリーニングキット(QuiaGen)と結晶化ロボット mosquito(TTP Labtech)を用いたシッティングドロップ蒸気拡散法で結晶化条件を探索した。粗結晶が得られた溶液条件をもとに、ハンギングドロップ蒸気拡散法にて結晶化条件の最適化を行い、X 線回折実験に使用する結晶を作製した。

糖鎖との複合体結晶について、10 mg/mL まで濃縮した SeviL 溶液に 10 mM asialo-GM1 を添加し、上記の方法と同様にして X 線回折実験に使用する結晶を作製した。

3) 変異体作製

目的箇所の塩基配列に変異を持つプライマーを作製し、クイックチェンジ法を用いて変異体プラスミドを作製した。

4) X 線回折実験・構造解析

高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory BL17A(茨城県つくば市)にて X 線回折実験を行なった。回折強度データを XDS、aimless で処理し、初期位相は自動分子置換パイプライン Balbes を用いて決定した。構造の構築と修正は COOT、構造精密化には構造解析プログラムパッケージ PHENIX を使用した。

5) 等温滴定型熱量測定(ITC)

精製した SeviL を透析にて 50 mM リン酸緩衝液, pH6.8, 100 mM NaCl に溶媒置換し、透析外液を用いてリガンド溶液を作製した。

測定には MicroCal ITC₂₀₀(GE ヘルスケア)を使用し、セルにタンパク質溶液を、シリンジにリガンド溶液を充填し、25°C で測定を行った。データ解析には解析ソフト Origin を用いた。

6) 超遠心分析(AUC)

リファレンス溶液(50 mM リン酸緩衝液, pH6.8, 100 mM NaCl)420 uL、リファレンスと同じ溶媒に溶解させた 30 uM SeviL を 400 uL 用意し、超遠心分析機 Optima XL-I(Beckman Coulter)を用いて沈降速度法による測定を行った。20°C、50,000rpm で遠心し、10 分毎に 280 nm の吸収波長をセル全長にわたって測定した。測定結果は SEDFIT を使用して解析した。

7) 核磁気共鳴(NMR)

$^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ と D-グルコースが含まれた M9 最小培地で大腸菌を培養することで、 ^{15}N で標識した SeviL を発現させた。サンプルを 50 mM リン酸緩衝液, pH6.8, 20 mM NaCl, 7% D₂O に溶解させ、asialo-GM1 の存在下、また非存在下で HSQC 測定を行い、リガンド結合に関与するアミノ酸残基を解析した。

またリガンド側の相互作用に関与する部位を特定するため、SeviL と GM1-b を使用して STD-NMR 測定を行なった。

8) 赤血球凝集活性試験

赤血球表面の糖鎖に結合して凝集体を作るというレクチンの活性を利用し、赤血球凝集活性の有無でレクチン活性を測定した。96-well プレートに 20 uL ウサギ赤血球を分注し、そこに 20 uL SeviL(10 ug/mL からスタートし、2 倍ずつ希釈した)を加えた。25°C で 1 時間静置し、赤血球が凝集する様子を観察した。

3. 研究結果

1) 結晶化・X 線回折実験

結晶化条件検討の結果、SeviL は 0.1 M citric acid, pH3.5, 3 M NaCl、asialo-GM1 との複合体結晶は 0.1 M MIB buffer, pH5.0, 25% PEG1500 の条件で良質な結晶を得ることができた。X 線回折実験の結果、および精密化の統計値を表 1 に示す。

得られた結晶について、Apo 体は分解能 1.7 Å、空間群は P321 に属していた。asialo-GM1 複合体は分解能 1.6 Å、空間群は P4121 に属していた。どちらの結晶も非対称単位中に 2 分子の SeviL が存在した。

表1. X線回折実験の結果および精密化の統計値

Data collection statistics		
Data-set	Apo	asialo-GM1 complex
Space group	P32 ₁	P4 ₁ 2 ₁ 2
Wavelength (Å)	0.98	0.98
Unit cell (Å)	a = 86.2, b = 86.2 c = 67.6	a = 61.6, b = 61.6 c = 136.8
Resolution range (overall/outer shell)	43.1–1.70/1.73–1.70	43.6–1.6/1.63–1.60
Reflections (measured/unique)	371,509/31,674	725,030/35,352
Completeness (overall/outer shell, %)	98.3/97.1	99.7/98.9
^a R _{merge} (overall/outer shell, %), Rpim	8.7/127.1/3.8	19.8/320.5/5.0
Multiplicity (overall)	11.7	20.4
Average I/σ(I) (overall/outer shell)	5.1/0.5	25.1/2.3
Refinement statistics		
	Apo (PDB 6LF1)	aGM1-bound (PDB 6LF2)
Resolution range (Å)	43.1–1.70	34.2–1.6
^b R-factor/free R-factor (%)	19.3/22.8	19.5/22.8
Rmsd bond lengths (Å)/angles (°)	0.005/0.74	0.006/0.80
No. of water molecules	113	138
Average B factors (Å ²) (protein/water/ligand)	30.2/31.1/–	14.8/19.3/19.0
% residues with favoured Ramachandran angles	100.0	100.0
% residues with outlier Ramachandran angles	0	0

(Kamata K et al. Sci. Rep. 10, 22102 (2020))

2) SeviL の立体構造

構造解析の結果から、SeviL は 3 つのサブドメインが回転対称に配置された β -トレフォイル構造という、R 型レクチンに特徴的な立体構造をとっていた。糖鎖との複合体の結晶構造から、SeviL は 1 分子あたり 1 つの糖鎖を認識していた(図 2)。

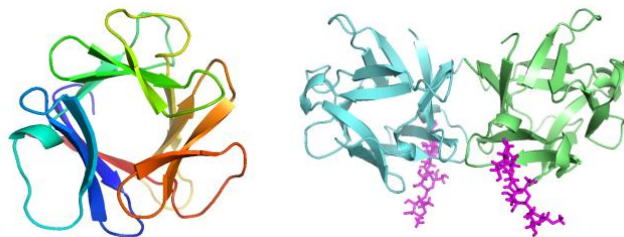


図2. SeviLの全体構造(左)と asialo-GM1複合体(右)

糖鎖結合部位には、水素結合を形成していると考えられるアルギニン、疎水性相互作用を持つフェニルアラニンやチロシンが存在しており、それらが糖鎖を両側から挟み込む形で結合していた。結晶構造から SeviL は、asialo-GM1(四糖)の先端三糖分(Gal-GalNAc-Gal)を認識して結合していた(図 3)。

末端の Glc は電子密度が低かったこと、周辺のアミノ酸残基との位置関係から、結合には関与していないことが示唆された。

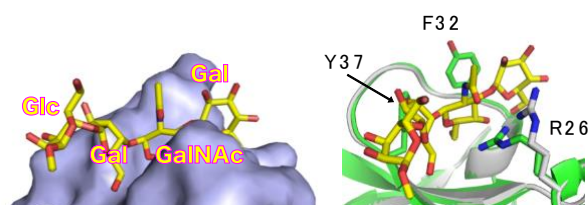


図3. 糖鎖結合部位の結晶構造

3) ITC

asialo-GM1、GM1b と、これらを構成する単糖であるガラクトース(Gal)、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)、グルコース(Glu)、二糖のラクトース(Lac)と T 抗原をリガンドとして相互作用解析を行った。

SeviLは単糖に対して、解離定数 $K_d=10$ mM 程度の親和性で結合していることが分かった。糖鎖に対しては、単糖の 100 倍ほど強く結合することが明らかとなった。

結晶構造解析の結果から、SeviL は Glu と結合しない可能性が示唆されていた。ITC による相互作用解析の結果からも、結合しないことが確認された。

	K_d (M)	結合強度比 (α -GM1を1とする)
Gal	8.0×10^{-3}	0.012
GalNAc	11.3×10^{-3}	0.008
Lac	7.2×10^{-3}	0.013
Glc	—	—
T	1.8×10^{-3}	0.053
α -GM1	9.5×10^{-5}	1.0
GM1a	—	—
GM1b	2.2×10^{-5}	4.3

図4. ITC測定の結果
(-は結合しないことを示す)

4) 超遠心分析(AUC)

野生型 SeviL(15.3kDa)は溶液中で分子量約 30kDa となり、二量体を形成していることが分かった。

結晶構造解析の結果から、Q12 と F126 が二量体形成に重要であると考えられたため、その 2 点に長い側鎖を導入した変異体 SeviL-Q12RF126K を作製した。溶液中での

会合状態を解析した結果、SeviL-Q12RF126K は溶液中で単量体になっていることが確認できた。

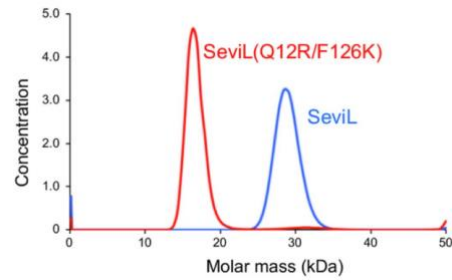


図4. AUCの測定結果 (Kamata K et al. Sci. Rep. 10, 22102 (2020))

5) NMR

asialo-GM1 非存在下、および存在下で測定した HSQC スペクトルを比較することで、糖鎖結合に関与する SeviL のアミノ酸残基を確認した(図 5A)。全体構造に大きな変化は見られなかったが、結晶構造において確認された糖鎖結合部位周辺のアミノ酸残基にシグナルの変化が見られた(図 5B)。SDT 法により GM1b との相互作用を解析した結果、中心の GalNAc が最も強く結合に関与し、両端の Neu5Ac と Glu は結合に関与しないことが分かった。(図 5C)

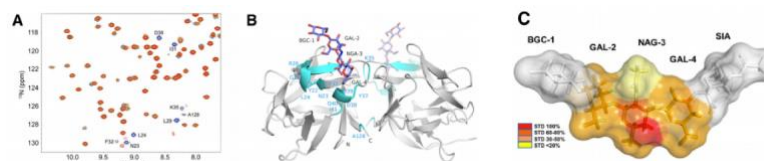


図5. NMR測定の結果 (Kamata K et al. Sci. Rep. 10, 22102 (2020))

(A) 2D ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル。スペクトルは、asialo-GM1 の濃度によって色分け (0 mM(黒), 0.05 mM(青), 0.1 mM(シアン), 0.2 mM(緑), 0.3 mM(黄), 0.5 mM(オレンジ), 1 mM(赤)) されている。asialo-GM1 の濃度が上がると、結合に関与するアミノ酸残基のシグナルが消失した。

(B) asialo-GM1 存在下で HSQC シグナルが変化するアミノ酸残基を、シアンで示した。(C) GM1b とのエピトープマッピング。糖鎖の両端(Neu5Ac、Glu)は、SeviL との有意な結合を示さなかった。

6) 血球凝集活性

野生型 SeviL (二量体) と SeviL-Q12R/F126K (単量体)、糖鎖結合部位に変異を入れて結合を阻害した変異体 SeviL-D39H を用いて、赤血球凝集活性試験を行った。野生型では血球細胞の凝集が見られ、変異体ではどちらも血球細胞の凝集が見られなかった。(凝集しない血球細胞は沈殿し、赤いドットが確認される。)

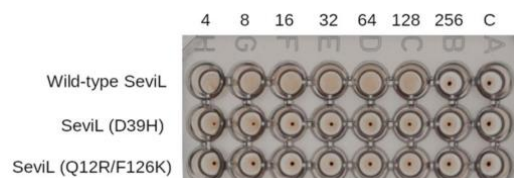


図6. 血球凝集活性試験の結果 (Kamata K et al. Sci. Rep. 10, 22102 (2020))

4. 討論

SeviL の asialo-GM1 への結合は、その構成成分である単糖に比べ、100 倍強いことが判明した。これは多くの R 型レクチンがポケットのようなくぼみで単糖に結合するのに対して、SeviL は長い糖鎖をはさむクリップのような結合形式をとることに由来すると考えられる。また asialo-GM1、GM1b を強く認識するのに対して、asialo-GM1 にシアル酸が付加された、枝分かれする糖鎖である GM1a への結合親和性を持たないことに関しても、シアル酸が SeviL のアミノ酸残基と立体障害を起こし、結合が阻害されることが要因だと分かった。

このような糖鎖認識の精度の高さは、特定の糖鎖を持つ細胞に特異的に結合してシグナルを伝え、細胞を調節する上で有利であると考えられる。

5. まとめ

- 1) SeviL の結晶構造(Apo 体、asialoGM1 複合体)を決定することができた。
- 2) ITC を用いて、糖鎖、単糖との結合親和性を測定した。
- 3) 単量体化する変異体を作製し、これを用いた赤血球凝集活性実験から、SeviL がレクチン活性を持つためには二量体であることが重要と分かった。
- 4) NMR 測定により、SeviL の糖鎖結合に関与するアミノ酸残基、また糖鎖の中で結合に関与する部位を特定した。

6. 論文リスト

<主論文>

Kenichi Kamata, Kenji Mizutani, Katsuya Takahashi, Roberta Marchetti, Alba Silipo, Christine Addy, Sam-Yong Park, Yuki Fujii, Hideaki Fujita, Tsuyoshi Konuma, Takahisa Ikegami, Yasuhiro Ozeki Jeremy R.H. Tame ; The structure of SeviL, a GM1b/asialo-GM1 binding R-type lectin from the mussel *Mytilisepta virgate*. Scientific Reports 10 22102 (2020)

<その他参考論文>

- 1) Laurens Vandebroek, Hiroki Noguchi, **Kenichi Kamata**, Jeremy R.H. Tame, Luc Van Meervelt, Tatjana Parac-Vogt, Arnout R.D. Voet ; Hybrid assemblies of a symmetric designer protein and polyoxometalates with matching symmetry. Chemical Communications 56 11601-11604 (2020)
- 2) Bram Mylemans, Ina Laier, **Kenichi Kamata**, Satoko Akashi, Hiroki Noguchi, Jeremy R.H. Tame, Arnout R.D. Voet ; Structural plasticity of a designer protein sheds light on β -propeller protein evolution. FEBS journal (in press) (2020)
- 3) Yuki Fujii, Marco Gerdol, Sarkar M.A. Kawsar, Imtiaj Hasan, Francesca

Spazzali, Tatsusada Yoshida, Yukiko Ogawa, Sultane Rajia, **Kenichi Kamata**, Yasuhiro Koide, Shigeki Sugawara, Masahiro Hosono, Jeremy R.H. Tame, Hideaki Fujita, Alberto Pallavicini, Yasuhiro Ozeki ; A GM1b/asialo-GM1 oligosaccharide-binding R-type lectin from purplish bifurcate mussels *Mytilisepta virgata* and its effect on MAP kinases. *FEBS Journal* 287 2612-2630 (2019)

4) Daiki Terada, Arnout R.D. Voet, Hiroki Noguchi, **Kenichi Kamata**, Mio Ohki, Chrisrine Addy, Yuki Fujii, Daiki Yamamoto, Yasuhiro Ozeki, Jeremy R.H. Tame, Kam Y.Z. Zhang ; Computational design of a symmetrical β -trefoil lectin with cancer cell binding activity. *Scientific Reports* 7 5943 (2017)

7. 参考文献

(1) Simona Notova *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **62**, 39-47 (2020)

(2) Yuki Fujii *et al.*, *FEBS J.* **287**, 2612-2630 (2019)

8. 用語集

*1 レクチン

抗体を除く、糖に結合するタンパク質、およびドメイン。免疫や感染などの生命現象に、糖鎖に結合することで関与している。また糖に結合する性質を利用して、糖鎖解析ツールとしても活用されている。

*2 asialo-GM1

Gal-GalNAc-Gal-Glc からなる四糖。GA1 と呼ばれる。ガングリオシド(シアル酸を構成糖とするスフィンゴ糖脂質)である GM1 からシアル酸が外れた糖脂質である。ナチュラルキラー細胞の表面に存在することが知られている。

*3 GM1b

asialo-GM1 の先端にシアル酸が付加された五糖(Neu5Ac-Gal-GalNAc-Gal-Glc)。細菌感染でできた自己抗体が原因となりヒトの神経細胞が攻撃されるギラン・バレー症候群の標的糖鎖のひとつとして知られる。

*4 R 型レクチン

リシンというレクチンにちなみ名付けられたレクチン家系。100 残基強のアミノ酸からなり、3 つの繰り返しドメインが回転対称に配置される β トレフォイル構造と呼ばれる立体構造を持つ。動植物をはじめ、微生物にまで幅広く分布しており、多様な糖鎖結合特異性を持っている点も特徴である。